

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-298062

(43)Date of publication of application : 05.12.1988

(51)Int.Cl.

G01N 33/569

G01N 33/543

(21)Application number : 62-133077

(71)Applicant : HITACHI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 28.05.1987

(72)Inventor : TANNO KAZUNOBU
IIJIMA HIROMI

(54) DETERMINATION OF ANTI -STREPTOLYSIN O ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To rapidly and accurately determine the anti-streptolysin O in serum by mixing the serum and the latex of an insoluble carrier of a for example, having specified grain size sensitized with the streptolysin O at a specific final concn. to induce a latex agglutination reaction and measuring the optical intensity.

CONSTITUTION: The serum and the latex of the insoluble carrier of $<0.2 \mu\text{m}$ grain size sensitized with the streptolysin O are mixed in such a manner that the final concn. of the insoluble carrier attains $<0.05\text{wt.}\%$ to prepare the liquid mixture. The liquid mixture is stirred in the initial period of mixing and is then kept standing in this mixing. The reaction is preferably effected at a constant temp. and in a manner that the reaction is completed in 5sec to 15min. The optical intensity is measured by selecting an adequate wavelength after this latex agglutination reaction. The anti-streptolysin O in the serum is determined from the measured value, by which the anti-streptolysin O in the serum is rapidly and accurately measured.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

③
アミカ

ストレプトリジンO抗体の定量法

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-298062

⑬ Int.Cl.⁴

G 01 N 33/569
33/543

識別記号

庁内整理番号

C-7906-2G
Y-7906-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)12月5日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 抗ストレプトリジンO抗体の定量法

⑯ 特 願 昭62-133077

⑰ 出 願 昭62(1987)5月28日

⑱ 発 明 者 丹 野 和 信 茨城県日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社
茨城研究所内

⑲ 発 明 者 飯 嶋 裕 巳 茨城県日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社
茨城研究所内

⑳ 出 願 人 日立化成工業株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 若林 邦彦

明 細 書

1. 発明の名称

抗ストレプトリジンO抗体の定量法

2. 特許請求の範囲

1. 血清とストレプトリジンOを感作した粒径

0.2 μ m未満の不溶性粗体のラテックスとを該不溶性粗体の最終濃度が0.05重量%未満となるように混合して混合液とし、抗原-抗体反応によるラテックス凝集反応を起こさせて、光学的強度を測定し、この測定値から血清中の抗ストレプトリジンO抗体を定量することを特徴とする抗ストレプトリジンO抗体の定量法。

2. ラテックス凝集反応を5秒～15分間、恒温で行なう特許請求の範囲第1項の抗ストレプトリジンO抗体の定量法。

3. 不溶性粗体が診断用ポリスチレン系ラテックス粒子である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の抗ストレプトリジンO抗体の定量法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は血清中の抗ストレプトリジンO抗体

(ASO)の迅速な定量法に関し、特にラテックス凝集比濁法を利用する定量法及びその定量試薬に関する。

〔従来の技術〕

溶レン菌はシヨウ紅熱、咽頭炎、化膿性疾患、急性腎炎、リウマチ熱などの起原菌として知られている。溶レン菌には種々の抗原物質が存在するので、感染により多くの抗体が産生される。溶レン菌の抗原物質はストレプトリジンO、デオキシリボヌクレアーゼB、ヒアルロニダーゼ、ニコチンアミアデニンジヌクレオチダーゼ、ストレプトキナーゼなどがある。

各種抗原物質と血清学的検査で検出できる抗体を表1に示す。



表 1 肺炎菌の抗原物質と抗体

菌体外毒素	対応する抗体
ストレプトリジンO	ASO
デオキシリボスクレアーゼB	AND-B
ヒアルロニダーゼ	AH
ニコチンアミドアデニンジヌクレオチダーゼ	ANAD
ストレプトキナーゼ	ASK

菌体外毒素に対する抗体は感染早期から産生されるため、ごく最近肺炎菌の感染があつたか否かの診断に本抗体の存在が重要な意義を有することが知られている。もつとも代表的な抗体として抗ストレプトリジンO抗体 (ASO) があげられ、広く日常検査で行なわれている。ASO価の測定方法を表2に示した。測定法は溶血阻止反応と受身凝集反応の二つの異なる原理に分かれる。前者はASOの毒力中和活性を、後者はASOの沈降素活性を利用した検査法である。



クリーニング試験にしか使用できない欠点があつた。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、血清とSLOを感作した粒径0.2 μm 未満の不溶性担体のラテックスとを該不溶性担体の最終濃度が0.05重量%未満となるように混合して混合液とし、抗原-抗体反応によるラテックス凝集反応を起こさせて、光学的強度を測定し、この測定値から血清中のASOを定量することを特徴とするASOの定量法に関する。

上記不溶性担体のラテックスとは、SLOを感作した不溶性担体を適当な媒体に分散させたラテックスである。該不溶性担体は、粒径が0.2 μm 未満である。この粒径が0.2 μm 以上では、吸光度の測定が困難になる。該不溶性担体としては、公知の診断用ポリスチレン系ラテックス粒子などがある。なお、不溶性担体は、粒径が0.05 μm 以上であるのが好ましい。また、上記媒体としては、リン酸緩衝液等が好ましく、媒体には、牛血清アルブミン、塩濃度調整のためにNaCl

表 2 ASO価測定法

溶血阻止反応	受身凝集反応
Rantz-Randall 法 マイクロタイター 法	ラテックス粒子を用いる方法 微生物担体に吸着したものを 用いる方法

〔発明が解決しようとする問題点〕

これらの検査法のうち前者の代表的な方法であるランツ-ランゲール (Rantz-Randall) 法はASOがストレプトリジンO (以下SLOと略す) の溶血作用を中和することを利用した半定量法で、患者血清を種々の倍数で希釈し、これを一定濃度のSLO、赤血球と反応させ、この時の溶血阻止希釈倍数を抗体量とする方法である。本法は血清希釈が非常に煩雑で、手間がかかり、また検査のために新鮮血清球を常時入手する必要があること、SLOも酸化に不安定で溶解後一定時間内に使用する必要があり、腫瘍の影響を受けやすいなどの問題があつた。

また、既販のラテックス凝集法は定性法で、ス

等の塩などを含むのが好ましい。不溶性担体は、媒体中に、適宜の濃度で分散させられるが、0.1～0.5重量%が好ましい。

血清と上記ラテックスとは混合され、これにより、抗原-抗体反応によるラテックス凝集反応が起こる。この混合時に、さらに、リン酸緩衝液等の希釈液を混合し、適当なラテックス濃度にされる。混合液は、混合初期に攪拌され、この後は、静置される。この混合液の濃度 (ラテックス凝集反応中の混合液における不溶性担体の最終濃度) は、0.05重量%未満にされ、また、0.01重量%以上であるのが好ましい。最終濃度が0.05重量%以上であると吸光度の測定が困難になり、小さすぎると凝集反応が不十分になりやすい。

また、上記反応は、25～37℃で行なうのが好ましく、反応中は恒温にするのが好ましい。この範囲をはずれると抗原-抗体反応が不安定になりやすい。さらに、この反応は、5秒～15分間行なわれるのが好ましく、特に10秒から10分

間行なわれるのが好ましい。5秒未満では、上記反応が不充分であり、光学的強度からASOを定量するのが困難になり、15分を越えると短時間測定の間所が短くなる。

上記ラテックス凝集反応後、反応液の吸光度が好ましくは530～1000nmの適切な波長を選択して測定される。

また、吸光度測定におけるセルの光路長は、5～10mmであるのが好ましい。

光学的強度とは吸光度又は散乱光強度を意味し、反応開始後の測定値のうち1個を用いて定量される。従つて、一定の光学的強度に達するまでの時間を測定するをも採用することができる。

定量は、ASO価既知量の試料（例えばASO価標準血清とその希釈系列）について、前記の測定を行ない、その測定値とASO価値とから検量線を作成しておき、ASO価未知量の試料について同一条件で測定した測定値から該検量線によつて対応するCRP量を求めることによつて行なうことができる。

以上は、散乱光強度でも同様である。

(実施例)

次に、試薬、測定方法、実験結果などに関連して本発明を詳細に説明する。以下、%は重量%を意味する。

1) 試薬

i) 希釈液

0.15M NaCl及び0.1%牛血清アルブミン含有、0.05Mリンリ酸緩衝液(pH6.50)

ii) ラテックス試薬

上記i)希釈液に溶レン菌から抽出精製したストリプトリジンOを感作した粒径0.2μ未満のポリスチレンラテックスを分散させた試液（ラテックス濃度0.1%）

2) 測定方法

上記の4種の液を調製し、各液を37℃で10分間恒温反応した後、570nmの吸光度を測定し、検体の吸光度(A_{ASO})を式、

反応開始後、1回測定する方法で、前記の2液型の試薬を用いる場合にはさらに、次のようにして定量する。すなわち、試料について吸光度

(A_T)を測定し、この値から試料に起因する吸光度(A_{RB})とラテックス試薬に起因する吸光度を差し引き、算出吸光度(A_{ASO})を求める。

ここで、試料に起因する吸光度とは、例えば、上記混合液の調整において、ラテックス試薬の代わりに生理食塩水を使用して得た液の光学的強度である。ラテックス試薬に起因する吸光度とは、例えば、上記した混合液の調整において、試料の代わりに生理食塩水を使用して得た液の吸光度(A_{RB})から、上記した混合液において試料及びラテックス試薬の代わりに生理食塩水を使用して得た吸光度(A_{SB})を差し引いた値である。

上記A_T、A_{RB}、A_{SB}からASO価に関する吸光度A_{ASO}が次の式により求められる。

$$A_{ASO} = A_T - A_{RB} - (A_{RB} - A_{SB})$$

A_{ASO}からASO価を定量する方法は、前記の定量の方法と同様である。

表3 組成及び吸光度

検体	検液	試料ブランク液(SB)	試料ブランク液(RB)	希釈液(RB)
検体	3μl	3μl	-	-
希釈液	350μl	350μl	350μl	350μl
ラテックス試薬	350μl	-	350μl	μl
生理食塩水	-	350μl	3μl	353μl
吸光度	A _T	A _{SB}	A _{RB}	A _{ASO}

$$A_{ASO} = A_T - A_{SS} - (A_{RB} - A_{BS})$$

から算出する。検体としてASO価高値検体の希釈系列を用いて吸光度とASO価(ドット単位)との希釈直線系列を作成した。測定は、日立自動分析装置705形(以下日立705形と略す)を用い、上記測定原理を適用した。日立705形では分析法プログラムの2ポイントエンド法を使用すると自動的に装置が上記測定法にもとづいて演算し、測定結果を算出する。反応温度は25℃～37℃、測定波長は570 nmを選択し、一波長測光を採用した。

3) 実験結果

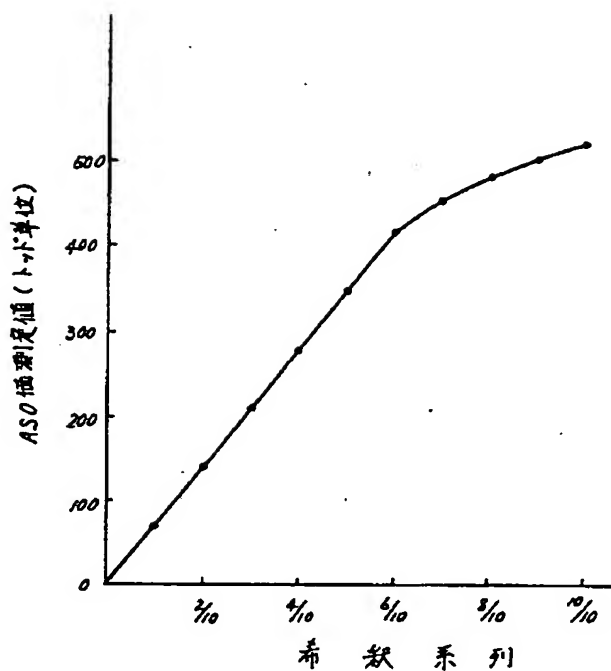
上記で得られた希釈直線性を第1図に示す。

〔発明の効果〕

本発明により、血清中のASOを迅速に精度良く定量することができ、そのための定量試薬を提供することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例において作成した希釈直線性を示すグラフである。



第1図